

Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität
Frankfurt am Main

(Direktor: Professor Dr. K. Herzberg)

**"Morphologische und biologische Eigenschaften eines
neuen fibroblasten-ähnlichen Dauer-Zellstammes EML
aus embryonalen Mäuselungen . . .
Gewinnung des Zellstammes und sein Virusspektrum"**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Hsin-lu SHU
aus Ningpo (China)

1962

**Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität
Frankfurt am Main**

(Direktor: Professor Dr. K. Herzberg)

**"Morphologische und biologische Eigenschaften eines
neuen fibroblasten-ähnlichen Dauer-Zellstammes EML
aus embryonalen Mäuselungen . . .
Gewinnung des Zellstammes und sein Virusspektrum"**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main**

**vorgelegt von
Hsin-lu SHU
aus Ningpo (China)**

1962

Referent : Professor Dr. K. HERZBERG

Korreferent: Professor Dr. R O T T E R

Dekan : Professor Dr. K. HERZBERG

Tag der mündlichen Prüfung:

27. Juli 1962



I n h a l t

	Seite
Einleitung	1
Material und Methodik	
1. Lösungen	3
2. Nährmedium	3
3. Kälberserum	3
4. Virusstämme	3
5. Züchtungsmethoden	
A. Anlage der Primärkultur von embryonalen Mäuselungen	4
a) Methode 1	
b) Methode 2 (Dulbecco und Vogt)	
B. Subkulturen	5
6. Morphologische Untersuchung der Zellkulturen	5
Ergebnisse:	
I. Vergleichende Untersuchung von zwei verschiedenen Methoden zur Anlage der Mäuselungenkultur	6
II. Feststellung der toxischen Wirkung des Waschmittels auf die Gewebekultur	6
III. Die Züchtung des Zellstammes EML	
1. Gewinnung des Zellstammes	9
2. Morphologische Wandlung des Zellstammes EML	12
A. Primärkultur.	
B. 1. - 5. Passage	
C. 6. - 9. Passage	
D. Nach der 10. Passage	
IV. Empfänglichkeit des Zellstammes EML für verschiedene Virusarten.	17
Besprechung:	22
Zusammenfassung:	28

Seit 1947 wurde die Gewebekulturtechnik durch systematische Forschungen von Earle und seinen Mitarbeitern weiter entwickelt. Ihre Anwendung findet mehr und mehr auf vielen wissenschaftlichen Gebieten statt. Besonders für die Virusforschung ist die Gewebekultur ein wichtiges Werkzeug geworden. Zur Isolierung und Vermehrung des Virus wurden entweder Frischzellkulturen oder Dauerzellstämme genommen. Die Frischzellkulturen, die von den Organen des Menschen oder der Tiere stammen, wie z.B. menschliche Amnionzellen- und Affennieren-Kulturen, sind gegenüber einigen Virus-Arten besonders empfänglich. Sie werden höchstens in 2 - 3 Reihen gezüchtet. Die cytopathischen Effekte sind sehr deutlich zu erkennen, weswegen sie zur Virusisolierung viel benutzt werden. Sie enthalten kein "hypothetical virus or transforming principle"* und können zur Virusimpfstoffherstellung verwendet werden. Die Züchtungsmethoden sind jedoch umständlich und geben keine gute Zellausbeute. Mitunter werden Viren, selten auch Mikrofilaria und Amoeba von dem Wirtsorgan durch Weiterzüchtung und Passage herausgezüchtet. (Rowe et al. 1953, Enders u. Peebles 1954, Rustigian et al. 1955, Hull et al. 1956, Malherbe u. Harwin 1957, Jahnes et al. 1957, Brown 1957, Ruckle 1958, Ruzicka 1959). Dagegen ist die Möglichkeit der latenten Infektion eines Dauerzellstammes sehr klein. Die Zellen des Dauerzellstammes sind einheitlich und bleiben in einem ziemlich langen Zeitraum unverändert. Sie sind auch für viele Virus-Arten empfindlich. Aus diesem Grunde werden immer wieder neue Dauer-Zellstämme gewonnen, um die Möglichkeiten der Virusdiagnostik zu erweitern.

Die Züchtung eines Dauer-Zellstammes aus Tumorgewebe zu virologischen Zwecken wurde zuerst von Gey (Zellstamm HeLa 1952) und später auch von anderen (LAC-Stamm von Baron und Rabson 1957, LN-Stamm von Bell u. Johnson 1956, Detroit-Stämme von Berman et al. 1955, 1956, KB-Stamm von Eagle et al. 1955, Maben-Stamm von Frisch et al. 1955, J-96 und J - 111 - Stämme von Osgood und Brooke 1955) beschrieben. Auch aus den Organen von Menschen und Tieren wurden viele

* Mit hypothetical virus or transforming principle" (Westwood et al., 1957) werden solche Agentien bezeichnet, welche die Eigenschaft besitzen, die normalen Zellen in bösartige Zellen umzuwandeln.

Dauer-Zellstämme gezüchtet (Chang 1954, Jordan 1956, Perry et al. 1956, Berman u. Stulberg 1956, Evans 1957, Fogh u. Lund 1957, Henle und Deinhardt 1957, Krech u. Wulff 1957, Swim u. Parker 1957, Syverton u. Mc Laren 1957, Westwood et al. 1957, Zitcer u. Dunnebacker 1957 Puck et al. 1958, Szanto 1959), darunter der bekannte FL-Stamm von Fogh und Lund und der Conjunctiva-Stamm von Chang. Leider gibt es bis jetzt noch keinen Dauer-Zellstamm, welcher für die Isolierung und Vermehrung des Influenzavirus brauchbar wäre.

Während der Anzüchtung des Dauer-Zellstammes unterliegen die Zellen einer beträchtlichen Wandlung. Viele Autoren haben über die Wandlung des morphologischen Bildes (Berman et al. 1957, Henle u. Deinhardt 1957 und andere), die Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit (Perry et al. 1956, Zitcer u. Dunnebacke 1957, Swim u. Parker 1957 und andere), die Änderung der Empfänglichkeit gegenüber bestimmten Viren (Swim u. Parker 1957, Sheffield u. Churcher 1957, Parker et al. 1957, Deinhardt u. Henle 1957, Brand u. Syverton 1959 und andere) und die "Transformation" der Zellen (Perry et al. 1956, Jordan 1956, Baron u. Rabson 1957, Henle u. Deinhardt 1957, Swim u. Parker 1957, Westwood et al. 1957, Zitcer u. Dunnebacke 1957) berichtet. Auch die Dauer-Zellstämme zeigen nach längerer Züchtungsdauer einige Veränderungen, wie z.B. die Umwandlung vom gutartigen Zustand zum bösartigen (Earle 1943, Earle et al. 1950, Gey 1954-55, Corriell et al. 1958, Fogh u. Hok 1958, Moore 1958, Sanford et al. 1954, Evans et al. 1958, Sanford 1958, Sanford et al. 1958, Mc. Allister u. Coriell 1959) und die Empfänglichkeitsänderung gegenüber bestimmtem Virus (Vogt u. Dulbecco 1958, Murphy u. Armstrong 1959, Wong u. Kilbourne 1961). Die Ursachen, die zu diesen Veränderungen führen, sind unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst eingehend untersucht, wie die embryonalen Mäuselungen-Fibroblasten sich von der Primärkultur zum Dauer-Zellstamm entwickeln. Die weitere Untersuchung erstreckte sich auf sein Virusspektrum und auf die Wirkung zugesetzter Kohlehydrate.

Material und Methodik

1. Lösungen:

Wir verwendeten in unseren Versuchen Phosphatpufferlösung (PBS), welche nach Dulbecco u. Vogt (1954) hergestellt wird. Zur Dispersion von Zellen wurden Versen- und Trypsin-Lösung genommen. Die Versenlösung hat folgende Zusammensetzung: Versen 0,2 gm in 1000 ml. Ca- und Mg-freie PBS gelöst und dann bei 110°C für 30' autoklaviert. Die Trypsinlösung (Difco 1:250 pH 7,6) wurde als 0,1 %ige Lösung in PBS zur Anlage der Primärkultur und Subkultur und als 0,2%ige zum Umsetzen des gewonnenen Zellstammes verwendet.

2. Nährmedien:

Das Kulturmedium, welches zur Gewinnung des Zellstammes EML verwendet wurde, bestand aus TCM Nr. 199 mit 20 % Kälberserum. Bei dem Virusinfektionsversuch verwendeten wir TCM Nr. 199.

3. Kälberseren:

Im Anfangsstadium kam nur das Einzelserum in Betracht. Nachdem der Zellstamm gewonnen worden war, wurde auch Mischserum verwendet. Alle Seren wurden durch Seitz-Filter sterilisiert, bei 56°C für 30' inaktiviert und bei - 20°C eingefroren. Vor dem Gebrauch wurden die Seren auf ihre Toxizität geprüft.

4. Virusstämme:

Wir verwendeten folgende Virusstämme: Poliovirus 1, 2, 3, Adenovirus 1, 2, 3, 4, 5, 7, Coxsackievirus A₉ und einen B-Stamm, ECHO-Virus 3, 4 und Vaccinevirus. Sie wurden regelmässig nach einer bestimmten Zeit durch die Amnion- oder HeLa-Kultur passiert und bei - 20°C eingefroren. Kurz vor dem Versuch hatten sie 2 - 3 Passagen in den Kulturen durchlaufen, bis sie in kurzer Zeit einen deutlichen cytopathischen Effekt zeigten.

Die eiadaptierten Influenzavirus-Stämme A PR₈, A₂ Asia, B FM₁ B Marburg 5, B Stockholm, Parainfluenzavirus 1 Sendai wurden aufgetaut und einmal im Allantoissack von 10 - 12 - tägigen

Bruteiern passiert. Die frischen Virussuspensionen wurden sofort zum Versuch benutzt. Die Mäuse-adaptierten Influenzavirus-Stämme A₂ Asia und B Marburg 5 wurden vor dem Versuch einmal durch Mäuselungenpassage aufgefrischt.

Die in unserem Labor isolierten 32 Herpesvirusstämme und frische Mäusegehirn-Passagen von MM- und SK-Virus wurden auch verwendet.

5. Züchtungsmethoden:

A. Anlage der Primärkultur von embryonalen Mäuselungen

a) Methode 1:

Nachdem die ca. 14-tägig trächtige Maus durch Äther getötet worden ist, werden die Lungen der Embryonen mit ophthalmologischen Pinzetten und Scheren herauspräpariert und in Stücke von ca. 1 mm Durchmesser zerkleinert. Die Lungengewebestücke werden dann in einem Reagenzglas mit PBS gewaschen und mit Trypsinlösung bei 37° C für ca. 45 - 60 Minuten angedaut, bis die Gewebestücke locker und etwas durchsichtig geworden sind. Die überstehende Flüssigkeit wird vorsichtig mit Kapillarpipetten abgezogen und das noch in dem Gewebestrebrei vorhandene restliche Trypsin durch langsamen Zusatz von 1 - 2 ml Nährmedium inaktiviert. Nach dem Abziehen des Überstandes wird das Sediment abwechselnd in einer kleinen Menge (ca. 2 - 6 ml) Nährmedium zerspritzt, bis sämtliche Zellen im Nährmedium suspendiert sind.

Die Zellsuspension wird mit Nährmedium bis auf $3 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt und in Kulturgefäße pipettiert. Nach 2 - 3 Tagen wachsen die Zellen zu einem Rasen aus.

b) Methode 2 (Dulbecco u. Vogt 1954):

Das embryonale Lungengewebe wird mit einer Schere zerkleinert, einmal mit PBS gewaschen und in einer kleinen Menge Trypsin bei 37° C im Wasserbad für 5 - 10' angedaut. Nach dieser Zeit wird das Kölbchen kräftig geschüttelt, dadurch wird ein grosser Teil der Zellen vom Gewebe abgelöst. Die Zellsuspension wird nach der Absetzung der Gewebestücke in einem Kölbchen bei 4° C im Eisbad gesammelt. Dem restlichen Gewebe wird Trypsin zugesetzt und der gleiche Vorgang 3 - 5 mal wiederholt, bis keine Gewebestücke mehr zu

sehen sind. Die gesammelte Zellsuspension wird einmal durch eine dreifache Lage Mull filtriert und bei 1000 - 1200 U./Min. 5' lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das Zellsediment im Nährmedium so aufgeschwemmt, dass darin ca. $3 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml enthalten sind. Die Anzucht erfolgt in Kulturgefäßen.

B. Subkulturen

Die Dauer einer Passage ist völlig von dem Wachstumszustand abhängig. Die Kultur wurde umgesetzt, sobald die gesunden Zellen bis auf mehr als die Hälfte des Gefäßbodens ausgewachsen waren. Dazu gießt man das Nährmedium ab und behandelt die Kultur mit Versen und Trypsin hintereinander je 15'. Die Zellsuspension wird bei 1000 U./Min. 5' lang abzentrifugiert und das Sediment wieder in das Nährmedium, in welchem die Zellen schon einen Tag lang gewachsen sind, aufgeschwemmt. Die Zellzahl beträgt in den ersten drei Passagen zwischen $4,0 - 7,0 \times 10^5$ /ml und in späteren Passagen zwischen $1,5 - 3,0 \times 10^5$ /ml. An jedem 2. Tag wird, je nach dem Wachstumszustand der Kultur, 2/3 des Nährmediums gewechselt oder 100 mg % Glukose (Zwartouw und Westwood 1958) zugegeben.

6. Morphologische Untersuchung der Zellkulturen:

Der Boden von Penicillinfläschchen (5 ml) wird mittels eines Diamantstiftes entfernt und in der Flamme zu einer Öffnung für Gummistopfen zusammengeschmolzen. Fläschchen und Objektträger werden mit 95 % igem Alkohol gereinigt, anschliessend 20 Mal mit Leitungswasser und drei Mal mit Aqua dest. gespült, getrocknet und in Heißluft sterilisiert. Bei dem Versuch taucht man den Hals eines Fläschchens in heisses Paraffin (Starrpunkt $56-58^{\circ}\text{C}$) und setzt es sofort mit dem Hals nach unten auf den sterilen Objektträger. Sobald das Paraffin erstarrt ist, wird 0,5 ml Zellsuspension jeder Passage in die Fläschchen pipettiert und die Kulturen mit Gummistopfen verschlossen. Nach 1 - 3 Tagen wird das Fläschchen von dem Objektträger entfernt und die Kultur einmal mit PBS gewaschen, mit Bouin-Lösung fixiert und mit Haematoxylin-Eosin gefärbt, mit einem Deckglas eingeschlossen und unter dem Mikroskop untersucht.

Ergebnisse

I. Vergleichende Untersuchung von zwei verschiedenen Methoden
zur Anlage der Mäuselungenkultur

Die Methode von Dulbecco und Vogt zur Trypsinierung der Zellen wurde früher als klassische Methode gewertet. Auch wir haben am Anfang des Versuches mit dieser Methode gearbeitet. Wegen der kleinen Zellausbeute und der vielen toten Zellen haben wir jedoch eine eigene Methode ausgearbeitet. Die Mäuselungen stammten aus 12-16-tägigen Mäuseembryonen. Zu jedem Versuch wurden 8 - 10 Embryonen genommen.

Tab. 1 Embryonale Mäuselungenkultur mit zwei verschiedenen Methoden

Versuch Nr.	Methode 1	Methode 2 (Dulbecco u. Vogt)
1	280×10^6	$8,8 \times 10^6$
2	240×10^6	$12,8 \times 10^6$
3	250×10^6	$10,0 \times 10^6$
4		$8,0 \times 10^6$
5		$12,8 \times 10^6$
Durchschnittsmenge	256×10^6	$10,5 \times 10^6$
Proportionen	24	1

Das Ergebnis besagt, dass wir mit unserer eigenen Methode ca. 24-mal soviel Zellen gewinnen können, wie mit der Methode von Dulbecco u. Vogt. Mehr als 90 % aller Zellen wachsen im Kulturgefäß aus. Es lässt sich daraus schliessen, dass die Zellen bei dieser Methode eine geringere Schädigung erfahren.

II. Feststellung der toxischen Wirkung des Waschmittels auf die Gewebekultur

Während der Züchtung des Zellstammes wurde wiederholt beobachtet, dass die Kultur gleich nach jedem Umsetzen deutliche Degenerationserscheinungen zeigte, die schon 2 Stunden nach dem Umsetzen auftraten. (Abb.1) Am nächsten Tag waren ca. 1/3 - 2/3 der Zellen degeneriert und vom Boden abgelöst. Die übrigen Zellen wuchsen aber weiter aus (Abb.1). Die Ursache war unklar. Um herauszufinden, ob das Waschmittel für diese toxische Schädigung verantwortlich war, wurde folgender Versuch gemacht.

1. Die Zellen der 12. Passage wurden nach der oben beschriebenen Methode verseniert und trypseniert und im Nährmedium aufgeschwemmt. Die Zellsuspension wurde in drei neuen Gefäßen je mit 8 ml beimpft. Das Gefäß A war mit Hemosol, das Gefäß B mit Rei und das Gefäß C mit 95 % Alkohol gereinigt.

Tab. 2 Verhalten des Zellstammes EML in den mit Hemosol, Rei und Alkohol gereinigten Gefäßen

Grad der Degeneration in	Zeit nach der Einsaat						
	1 St.	2 St.	3 St.	5 St.	1 Tag	2 Tage	3 Tage
Gefäß A (Hem.)	-	+	++	+++	+++	+	-
Gefäß B (Rei)	-	+	++	+++	+++	+	-
Gefäß C (Alk.)	-	-	-	-	-	-	-

Bemerkung: - = keine Degeneration

+ = Degenerierte Zellen nicht über 10 %

++ = " " zwischen 10 - 25 %

+++ = " " 25 - 50 %.

Das Ergebnis zeigt, dass sowohl Hemosol als auch Rei-Moleküle so fest an der Gefäßwand haften, dass sie nach 20-maliger Ausspülung mit Leitungswasser und dreimaliger Nachspülung mit Aqua dest. nicht vollständig entfernt werden können. Die restlichen Hemosol- oder Rei-Moleküle üben dann eine toxische Wirkung auf die Zellen aus. Ein ähnliches Bild wurde auch bei Hostapon beobachtet.

2. Auf Grund dieses Befundes wurde untersucht, ob ohne Hemosolbehandlung, also allein nach der Wasser-Reinigung, die Gefäße für die Gewebekultur verwendet werden können.

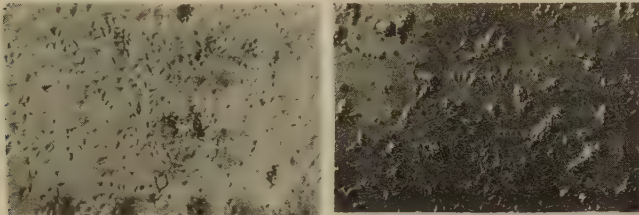
Die gebrauchten Gefäße wurden über Nacht mit Leitungswasser gefüllt, am nächsten Tag mit Bürsten mechanisch ohne jeden Putzmittelzusatz gereinigt, anschliessend 20 - mal mit Leitungswasser und dreimal mit Aqua dest. gespült. Sie wurden dann getrocknet, mit Aluminium-Folie verschlossen und sterilisiert.

Tab. 3 Gegenüberstellung des Verhaltens von EML - Zellkulturen in einmal mit und einmal ohne Hemosol gereinigten Gefäßen.

Grad der Degeneration in	Zeit nach der Einsaat						
	1St.	2St.	3St.	5St.	1Tag	2Tag	3Tag
Gef. mit Hemosol	-	+	++	+++	+++	+	-
Gef. die früher mit Hemosol gereinigt wurden. Danach							
1. einmal ohne Hemosol gereinigt	-	-	+	+	-	-	-
2. zweimal ohne Hemosol gereinigt	-	-	-	-	-	-	-
3. 20-mal ohne Hemosol gereinigt	-	-	-	-	-	-	-

Wie das Ergebnis dieses Versuches zeigt, wurden die Hemosolmoleküle erst nach zweimaliger Benutzung und Reinigung vollständig entfernt. Die Zellen wachsen in solchen Gefäßen genau so gut wie in den mittels komplizierten Methoden gereinigten Gefäßen. Deswegen wurden alle Gefäße in späteren Versuchen nur noch mit Leitungswasser ohne jeden Waschmittelzusatz mechanisch gereinigt. Anschliessend 3 x mit Aqua dest. gespült, getrocknet, mit Aluminium-Folie verschlossen und in Heißluft sterilisiert.

Abb. 1 Cytotoxische Wirkung der restlichen Hemosolmoleküle in dem Gefäß auf die EML-Kultur (6 Stunden nach dem Umsetzen) (Vergrößerung: 1:120)



Kontrollkultur

cytotoxische Wirkung des
Hemosols

III. Die Züchtung des Dauer-Zellstammes EML

1. Die Gewinnung des Dauer-Zellstammes

Die Zellen stammten aus dem Lungengewebe von 16-tägigen Mäuseembryonen. Die Einsaatzahl der Primärkultur und der ersten drei Passagen belief sich auf $4,0 - 12,0 \times 10^5$ Zellen/ml. Innerhalb von 2 - 3 Tagen wuchsen die Zellen zu einem geschlossenen Rasen aus. Die Zellen waren in den ersten zwei Passagen rund und hatten ein klares Protoplasma. In der 3. Passage zeigte sich eine leichte Granulierung im Zellplasma. In der 4. Passage war die Schädigung deutlicher. Die Kultur zeigte eine langsam fortschreitende Degeneration, welche mit der Zeit immer stärker wurde. Das Zellwachstum war nach ca. 10 Tagen auf ein Minimum gesunken. Auch der Stoffwechsel der Kultur erschien anormal, da der pH-Wert sich schneller als anfangs nach der sauren Seite verschob. Je nach dem Verhalten mußte täglich das Nährmedium gewechselt oder Natriumbikarbonatlösung zugegeben werden, um einen konstanten pH-Wert aufrechtzuerhalten. Diese Degeneration liess sich weder durch eine Erhöhung des Serumzusatzes auf 30 - 40 % zum Nährmedium, noch durch eine Erniedrigung auf 5 - 10 % beheben. Hier wurde die Beobachtung gemacht, dass die Reinigung mit Waschmitteln (Hemosol), wie sie bei den meisten Gewebekulturen üblich ist, die Schuld an diesen Veränderungen trug. Auch länger

gelagertes Nährmedium, welches einige wichtige Nährsubstanzen verloren hatte, war an der Schädigung beteiligt. Ca. 30 Tage nach der 4. Passage verbesserte sich die Kultur allmählich. Am Ende der 4. Passage wurden reichlich neu ausgewachsene Zellen beobachtet.

Die Zellkultur änderte sich in der 4. Passage morphologisch ziemlich stark. Mit der Zeit wurde die typisch radiäre Anordnung der Zellen undeutlicher, der Unterschied in der Färbbarkeit und Größe der Kerne nahm zu. Riesenzellen waren selten zu sehen. Der Wandlungsvorgang ging in den späteren Passagen weiter. Am 11. Tag nach der 5. Passage wurden an einer Stelle der Kultur einige polygonale, etwas grössere Zellen beobachtet, welche bereits das morphologische Bild des jetzigen Dauer-Zellstammes zeigten. Die Vermehrung dieser Zellen war nicht stärker als die der anderen Zelltypen. Die Reaktion der Zellen verschiedener Passagen auf Hemosol war unterschiedlich. Vor der 8. Passage wurden die Zellen von Hemosol schwerer geschädigt als nach der 8. Passage. Das cytotoxische Bild war vor der 8. Passage unauffällig. Die Kultur zeigte eine uncharakteristische Degenerationserscheinung wie die überalterte Kultur, d.h. das Wachstum war bedeutend verlangsamt, die meisten Zellen waren dünn, spindelig und granuliert. Zunehmend lösen sich Zellen aus dem Zellrasen und schwimmen in der überstehenden Nährflüssigkeit. Von der 9. Passage ab lag das charakteristisch cytotoxische Bild vor, wie die Abb. 1 zeigt. Die Zellen, die nach 2 Tagen noch erhalten waren, wuchsen wieder zu einem Rasen aus. Obgleich die morphologische Umwandlung der Kultur zu ihrer endgültigen Form noch an vereinzelt Zellen zu sehen war, zeigte sich hier bereits eine Empfindlichkeit gegenüber Hemosol, wie sie auch die endgültige Kultur bei gleicher Schädigung zeigt.

Auch in der 9. Passage zeigte die Kultur gleich nach dem Umsetzen die übliche cytotoxische Degenerationserscheinung. Bevor sie sich jedoch hätte erholen können, war die Temperatur im Brutschrank durch ein Versehen auf ca. 41°C gestiegen und 5 Tage lang unbemerkt auf diesem Stand geblieben. Die Zellen wurden dadurch so stark geschädigt, dass die Kulturen für längere Zeit keine Vermehrung zeigten. Der Zusatz von wachstumsfördernden Substanzen wie Embryonal-extrakt, Katalase (Lieberman u. Ove 1958) oder RNS von HeLa-Zellen

Tab. 4 Überblick über den Züchtungsvorgang des Dauer-Zellstammes EML

Passage Datum Nr. Dauer	Gesamte Züchtungs- dauer in Zellen/ ml Tagen	Einsatzzahl in Zellen/ ml	Morphologie der Zellen	Wachstum	Zustand, Verhal- ten	Ursache der Schädigung
26.4. - -	-	12×10^5	Fb., Ep.-Inseln	gut	gesund, normal	-
30.4. 1 4	4	$7,3 \times 10^5$	Fb.	gut	gesund	-
4.5. 2 5	9	$5,8 \times 10^5$	Fb.	gut	gesund	-
7.5. 3 3	12	$4,2 \times 10^5$	Fb.	gut	leicht granuliert	-
12.5. 4 5	17	$2,8 \times 10^5$	Fb.	langsam bis auf Minimum gesunken, nach 30Tg. wieder besser	langsam fortschrei- tende Degeneration, später wieder Bes- serung	Hemosol medium
25.6. 5 44	61	$1,0 \times 10^5$	kurzspind.Fb. keine typische Anordnung mehr. Sehr wenige po- lygonale Zellen (am 7.7.)	langsam	schwach	Hemosol
21.7. 6 26	87	$2,0 \times 10^5$	wie oben	etwas schneller	besser (mit gebräut. Gefäß)	
25.7. 7 4	91	$1,7 \times 10^5$	wie oben	wie oben	noch besser (mit gebr. Gefäß)	
1.8. 8 7	98	$1,5 \times 10^5$	wie oben	schneller	gut, wieder eine richtige Vermeh- rung (m.gebr.Gefäß)	-
6.8. 9 5	103	$2,2 \times 10^5$	Fb.nach 40 Tg. nach 8 Tg.bis auf eine Vermehrung Minimum gesunken, nach 40 Tg.wieder d.polygon.Zell. besser		leichte Hemosol- Schädigung.Stärke degeneriert nach 8 Tg. 40 Tg. später wieder gesund	Hemosol Temp. bis auf ca. 41°C
7.10. 10 61	164	$1,8 \times 10^5$	anfangs:Fb.;Stamm- zell.= 10; 1 nach 10 Tg. ! Fb.;Stammz.= 1;9	gut	Hemosol-Schädig.	Hemosol
19.10. 11 12	176	$2,1 \times 10^5$	Anfangs: Fb.;Stammz. = 1; 20	gut	Hemosol-Schädig.	Hemosol
24.10. 12 5	181	$2,0 \times 10^5$	Stammzellen	gut	Hemosol-Schädig.	Hemosol
31.10. 13 7	188	$2,4 \times 10^5$	Stammzellen	gut	Hemosol-Schädig.	Hemosol
7.11. 14 7	195	$2,1 \times 10^5$	Stammzellen	gut	gesund	-
11.11. 15 4	207	$1,8 \times 10^5$	Stammzellen	gut	gesund	-

(Chevremont 1957) brachte kein vermehrtes Wachstum. Erst nach ca. 40 Tagen begannen die Zellen sich zu vermehren. Besonders die polygonalen Zellen, welche morphologisch zu dem endgültigen Zellstamm gehörten, hatten die Tendenz, schneller zu wachsen. Sie verdrängten langsam die anderen Zelltypen aus der Kultur und setzten nach drei weiteren Passagen (ca. 40 Tagen) die gesamte Kulturfläche. Von der 12. Passage an war die Wachstumsgeschwindigkeit beständig. Die Zellen wurden regelmässig nach 3 - 8 Tagen umgesetzt und sind jetzt in der 90. Passage. (Siehe Tabelle 4).

2. Morphologische Wandlung des Dauer-Zellstammes EML

Bei jedem Umsetzen wurden auch einige Zellen direkt auf dem Objektträger gezüchtet, wie es unter 6 beschrieben ist. Nach 1 - 3 Tagen wurde diese Kultur mit Bouin-Lösung fixiert, mit Haematoxylin-Eosin gefärbt und mit Deckgläsern eingeschlossen. Obgleich die Einsaatzahl und der Zustand verschieden waren, konnten doch die morphologischen Bilder miteinander verglichen werden.

A. Primärkultur

Das morphologische Bild ist typisch für die Lungengewegekultur. Die Mehrzahl der Zellen sind Fibroblasten. Vereinzelt finden sich Inseln, die aus 10 - 40 Epithelzellen bestehen. Weiterhin lassen sich einige Zellelemente finden, die, einzeln liegend, nach Willmer (1958) als Wanderzellen bezeichnet werden können. Der Zellkern der Fibroblasten ist klein, oval und gleichmässig gefärbt und hat 1 - 4 kleine Nukleolen. Das Zytoplasma ist gleichmässig gefärbt und sendet viele lange feine Fortsätze nach allen Richtungen, die miteinander ein Netzwerk bilden. Die Anordnung der Zellen ist fischzugartig.

(Abb.2)

B. 1. - 5. Passage

Die fünf Passagen erfolgten innerhalb zweier Monate. Die Epithelinseln und die Wanderzellen sind nach der 1. Passage nicht mehr zu sehen. Die Fibroblasten hatten in den ersten zwei Passagen typische radiäre Anordnung, welche später allmählich undeutlicher wurde. Ihre Form ist anfangs langspindelig, später kurzspindelig. Mit der Zahl der Passagen werden die Kerne grösser und der Unterschied im Durchmesser deutlicher. Die Zahl, die Form und die Grösse der Kernnukleolen ändern sich ebenfalls stark. Manche Kerne haben viele kleine runde Nukleolen, manche aber nur 1 - 2 grosse runde oder stabförmige Nukleolen. Manchmal wurden auch einige Kerne mit einem grossen runden oder stabförmigen und 2 - 5 kleinen runden Nukleolen beobachtet. Riesenkerne und vielkernige Zellen sind jetzt noch selten zu sehen.

C. 6. - 9. Passage

Die 6. - 9. Passage erstreckte sich über 40 - 50 Tage. Die Anordnung der Zellen ist in den vorhergehenden Passagen unregelmässig geworden. Die Zellen sind jetzt nicht mehr ^{so} spindelig

wie in den früheren Passagen. Sie besitzen eine mehr unregelmässige Form. Die richtigen spindeligen Zellen sind selten zu sehen. Das Netzwerk, das durch die Zellfortsätze gebildet wird, ist an manchen Stellen locker, an manchen Stellen gar nicht vorhanden, weswegen man an den dicht zusammengewachsenen Zellen nicht mehr erkennen kann, ob es Fibroblasten sind. Meist sind die Zellen einkernig, selten zweikernig. Die Größe der Kerne ist sehr verschieden. Die Zahl der abnormalen Kerne nimmt immer mehr zu. Die Nukleolen werden bezüglich Form, Zahl und Größe viel unregelmässiger als in den Zellen der früheren Passagen. Das Zytoplasma bekommt allmählich eine netzartige Beschaffenheit. Außer diesen allgemeinen Veränderungen sieht man in den Präparaten einen neuen Zelltyp, welcher vereinzelt vorhanden und etwas kräftiger gefärbt ist. Im Vergleich mit den anderen Zellen ist diese Zellart grösser. Sie hat einen grösseren, rundlichen oder ovalen Kern mit 1 - 2 unregelmässigen Riesennukleolen. Das Zytoplasma enthält viele kleine Vakuolen und acidophile Granula, manchmal auch Einschlusskörperchen. Diese Zellen vermehren sich zuerst nur langsam und erst am Ende der 9. Passage zeigen sie ein schnelleres Wachstum als die übrigen Zellen.

D. Nach der 10. Passage

Der neue Zelltyp vermehrt sich in der 10. Passage weiter. Nach zwei Passagen beherrscht er die ganze Kulturfläche. Die anderen Zelltypen sind verschwunden. Die Zellen des neuen Zelltyps, welche eine polygonale bis unregelmässige Form besitzen, sind an dicht bewachsenen Stellen nicht so groß wie an Stellen, wo sie vereinzelt vorkommen. Ihre Anordnung ähnelt der von epithelialen Zellen, doch bilden sie keine Zellinseln.

Der ganze Zellumwandlungsvorgang wird zusammenfassend in zwei Stadien geteilt:

1. Stadium = Fibroblastenstadium

Die langspindeligen Zellen werden kurzspindeliger, ihre radiäre Anordnung wird immer undeutlicher und ist schließlich verschwunden. Mit höherer Passagezahl wird der Größenunterschied der Kerne deutlicher. Die Zahl der Nukleolen vermehrt sich allmählich, aber sie wird nach dem Auftreten der Riesennukleolen wieder geringer. Dieses Stadium dauerte ca. 100 Tage. Nach dieser

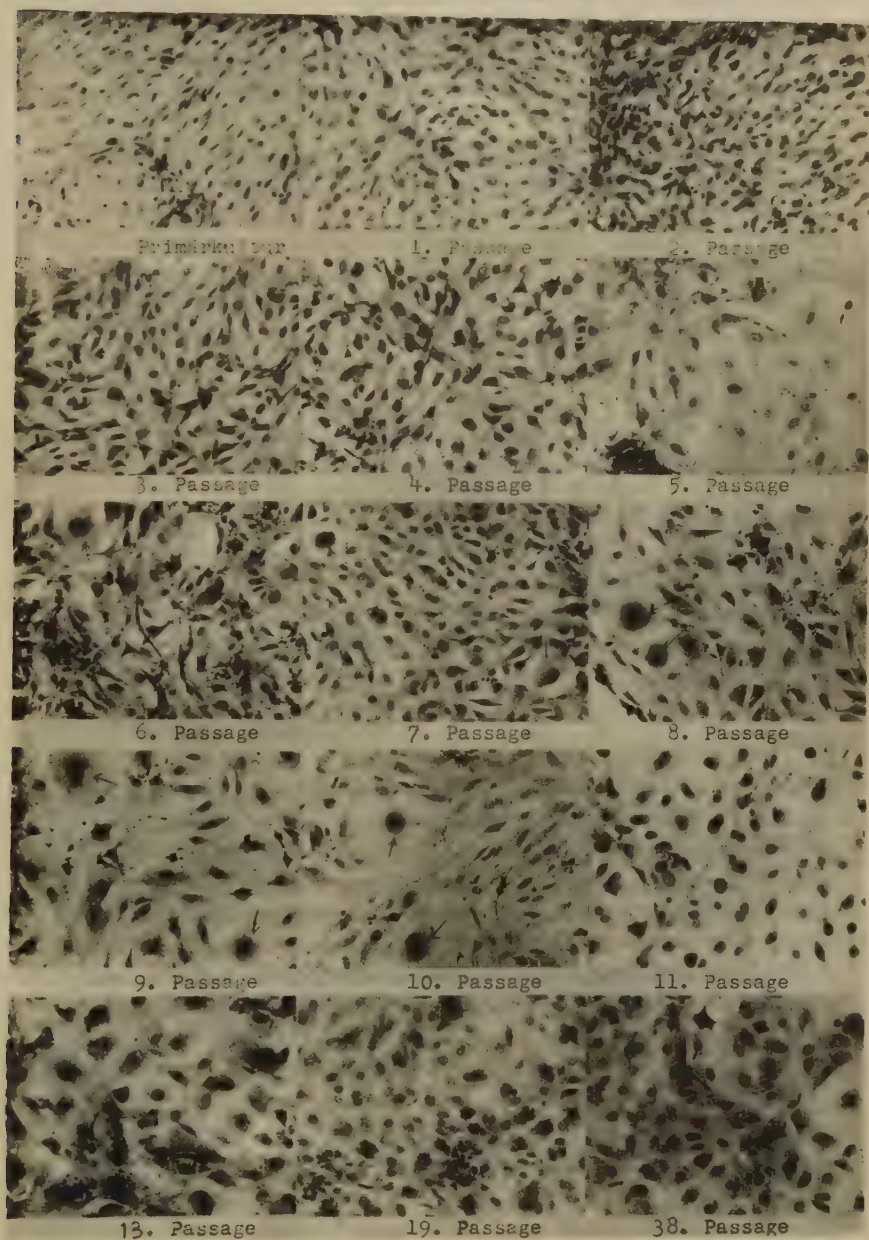
Zeit vermehren sich die Zellen des neuen Zelltyps deutlich und bestimmen bald das Bild der Kultur.

2. Stadium = Hyperchromatisches fibroblasten-ähnliches Stadium

Dieser Zelltyp wurde zuerst in der Mitte der 5. Passage beobachtet. Ca. 70 Tage später beginnen die Zellen schneller zu wachsen. In der 12. Passage beherrschen die Zellen die ganze Kulturfläche. Die Zellen färben sich stärker an, weshalb sie als hyperchromatisch fibroblastenähnlich bezeichnet werden.

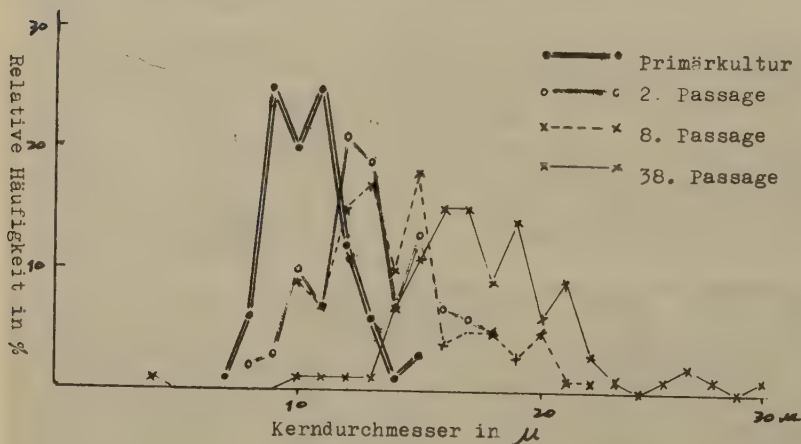
Aus den umstehenden Bildern ist deutlich zu erkennen, wie die Mäuselungenkultur sich allmählich in die Zellstammkultur verwandelt.

Abb.2 Morphologische Bilder des Dauer-Zellstammes EML von Primärkultur und 1. - 11., 13., 19. und 38. Passage
(Haematoxylin - Eosin) (Vergrößerung 1:200)



Vergleichen wir den durchschnittlichen Kerndurchmesser der Zellen von der Primärkultur mit dem der Zellen von der 2., 8. und 38. Passage, so finden sich ebenfalls deutliche Unterschiede. Für diesen Versuch wurden von jeder der verglichenen Gruppen jeweils 400 Kerne mit Hilfe eines Okularschraubenmikrometers vermessen.

Abb. 3 Vergleich des Kerndurchmessers der Zellen von der Primärkultur und von der 2., 8. und 38. Passage.



Aus der Abb. 3 ist zu ersehen, dass die Primärkultur vorwiegend aus Zellen mit einem Kerndurchmesser von ca. 10μ besteht. Mit steigender Passagezahl nimmt nicht nur die Streuung der Kerngrößen zu, sondern auch der absolute Durchmesser der Kerne. Diese Beobachtung entspricht also nicht dem Ergebnis von Schwoebel und Siedentopf an Schweinenieren (1961), nach welchem die Primärkultur von Schweinenieren aus verschiedenen Zelltypen und die Dauerzellkultur der Schweinenieren fast ausschließlich aus einem sehr kleinen Zelltyp bestand.

IV. Empfänglichkeit des Dauer-Zellstammes EML gegenüber verschiedenen Virus-Arten

Polio-, Adeno-, Coxsackie-, ECHO- Herpes und Vaccine - Virusstämme wurden vor dem Versuch 2 - 3 mal durch Amnionkulturen passiert, bis sie einen deutlichen cytopathischen Effekt zeigten. Die Virussuspensionen wurden dann mit TCM Nr. 199:1 : 100 verdünnt und auf die 2 - 3 tägigen EML-Kulturen der 25. - 28. Passage geimpft. Gleichzeitig wurden die Amnionkulturen als Kontrolle mit denselben Virusdosen infiziert. Nach 3 Tagen wurden die überstehenden Flüssigkeiten im Verhältnis 1:10 verdünnt und auf neuen EML-Kulturen geimpft. Es wurden jeweils fünf Passagen durchgeführt und jede Passage bis zum 10. Tage auf cytopathische Veränderungen kontrolliert.

Tab. 5 Empfänglichkeit der EML- und Amnion - Kultur gegenüber verschiedenen Virus-Arten

Virus - Arten	Zellen	
	EML	Amnion
Poliovirus 1, 2, 3	-	+
Adenovirus 1, 2, 3, 4, 5, 7	-	+
Coxsackievirus A ₉ , B	-	+
ECHO-Virus 3, 4	-	+
Herpesvirus	+	+
Vaccinevirus	-	+

Wie die Tabelle 5 zeigt, verursacht nur das Herpesvirus in der EML-Kultur einen cytopathischen Effekt. Die Zellen sind für andere Virus-Arten unempfindlich.

Die mit MM- und SK-Virus infizierten Mäusegehirne wurden in einer kleinen Menge PBS suspendiert, mit TCM Nr. 199 von pH 7,2 - 7,3 im Verhältnis 1:100, 1:1000, 1:10000 verdünnt und damit die EML-Kulturen der 37. Passage beimpft. Der Haemagglutinationstiter des MM-Virus gegen Hühnererythrocyten betrug 1:1280 und der des SK-Virus 1:640. Es wurden fünf Passagen durchgeführt. Die Kulturen jeder Passage waren bis zum 10. Tage unter mikroskopischer Kontrolle.

Tab. 6 Empfänglichkeit der EML-Kultur gegenüber
MM- und SK-Virus

V i r u s	EML - Zellen	
	C P E	HA-Titer
MM-Virus		
1:100	-	-
1:1000	-	-
1:10000	-	-
SK-Virus		
1:100	-	-
1:1000	-	-
1:10000	-	-

Es wurde kein cytopathischer Effekt beobachtet. Auch konnten keine positiven Haemagglutinationstiter festgestellt werden.

Frisch ei-adaptierte und mäuse-adaptierte Influenza- und Parainfluenzavirus-Stämme, deren Haemagglutinationstiter aus Tab. 7 zu ersehen sind, wurden im Verhältnis 1:1000 bzw. 1:2000 verdünnt und damit die EML-Kultur von der 35. Passage und die Primärkultur von Affenniere (als Kontrolle) beimpft. Nach zwei Tagen wurde der Haemagglutinationstiter bestimmt und nach fünf Tagen der Haemadsorptionstest (Shelokov 1958) mit Hühnererythrocyten durchgeführt. Die Kulturen wurden bis zum 5. Tag täglich kontrolliert.

Tab. 7 Empfänglichkeit der EML- und Affenniere-Kultur gegenüber verschiedenen Typen von Influenza- und Parainfluenzaviren.

Influenza- und Parainfluenzavirus			Z e l l e n					
Stamm	HA-Titer	Verd.	E M L			Affenniere		
			CPE	HA-Tit.	H. Ads.	CPE	HA-Tit.	H. Ads.
Ei-adaptierte Viren:								
A PR ₈	2560	1:1000	-	-	-	+	16	+
A ₂ Asia	2560		-	-	-	+	16	+
B FM ₁	1280		-	-	-	+	8	+
B Marburg 5	320		-	-	-	+	32	+
B Stockholm	1280		-	-	-	+	2	+
Sendai	2560		+	4	+	+	128	+
Mäuse-adaptierte Viren:								
A ₂ Asia	1280	1:2000	+	16	+	+	32	+
B Marburg 5	640		±	2	+	+	32	+

Die Kulturen sind gegenüber dieser Virus-Gruppe wenig empfänglich. Ausser dem Stamm Sendai und dem mäuse-adaptierten Stamm Asia erzeugen die anderen Typen keinen cytopathischen Effekt und kein Haemagglutinin. Der Haemadsorptionstest ist wenig spezifisch, da bei einigen lang gezüchteten und leicht geschädigten Kontroll-Kulturen ebenfalls schwach positive Reaktionen beobachtet wurden. Die EML-Kultur produziert nach der Infektion mit dem Stamm Sendai oder mäuse-adaptiertem Stamm Asia nur wenig nicht infektiöses Haemagglutinin. In der nächsten Passage zeigt die Kultur keinen cytopathischen Effekt und bildet kein Haemagglutinin mehr.

Da die EML-Zellen für Herpesvirus gut empfänglich sind, sollte geprüft werden, ob sich alle im Institut vorhandenen 34 Herpesstämme auf den Zellen gleich verhalten. Die eingefrorenen Virusstämme wurden in 2 - 3 Passagen über Amnionkulturen geführt, bis sie einen deutlichen cytopathischen Effekt zeigten. Sie wurden dann im Verhältnis 1:100 mit TCM Nr. 199 verdünnt, in EML-Kulturen der 40. Passage eingepflegt und täglich bis zum 7. Tag unter dem Mikroskop kontrolliert. Die meisten Stämme zerstören die Zellkulturen innerhalb von drei Tagen. In der 2. Passage war jedoch ein Unterschied zwischen den Herpesstämmen nicht mehr festzustellen. Um zu sehen, ob die EML-Zellen eine verschieden große Virusmenge produzierten, wurden die EML-Kulturen mit 10^3 ID₅₀ Virusdosen der Herpesstämme 1, 8, 23, 25 und 32 beimpft. Drei Tage später wurde der ID₅₀ - Titer bestimmt.

Tab. 8 Infektiositätstiter verschiedener Herpesvirus-Stämme in EML-Kultur

Passage Nr. in EML-Kultur	ID ₅₀ - Titer der Herpesvirusstämme				
	1	8	23	25	32
0	$10^{3,5}$	$10^{3,2}$	$10^{3,2}$	$10^{3,3}$	$10^{3,6}$
2	$10^{3,8}$	$10^{3,5}$	$10^{3,8}$	$10^{4,0}$	$10^{4,0}$

Die Unterschiede der ID₅₀ - Titer liegen innerhalb der Fehlerbreite. Es lassen sich also mit den EML-Zellen die Herpesstämme weder im cytopathischen Effekt noch in ihrer Vermehrungsrate unterscheiden.

In der Literatur finden sich Angaben, dass die Empfänglichkeit einer Zellkultur gegenüber bestimmten Virus-Arten, wie z.B. dem Poliovirus oder dem Influenzavirus durch Zusatz von Glukose und Glutamin (Darnell u. Eagle 1958), Cystin (Tyndall u. Ludwig 1960) oder L-Methionin (Ackermann 1951) erhöht werden kann. Solche Kulturen zeigen einen deutlich cytopathischen Effekt und produzieren mehr Virus als Kulturen ohne die obengenannten Substanzen. Es wird auch beschrieben, daß ein resistenter Zellstamm nach mehreren Passagen gegenüber bestimmtem Virus empfänglich wird (Sheffield und Churcher, 1957, Brand u. Syverton 1959, Parker et al. 1957, Vogt et al. 1958).

In folgendem Versuch wurde untersucht, ob die Kultur nach 32 Passagen (5 Monaten) für einige Virus-Arten empfänglich wurde und ob die Virusproduktion durch den Zusatz von bestimmten Zuckern erhöht wird.

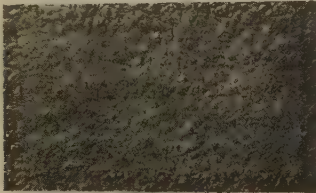
Die EML-Zellen der 56. Passage wurden in dem Kulturmedium mit je 100 mg Glykogen und Mannose, Stärke und Maltose und als Kontrolle dazu - ohne diese Zusätze, gezüchtet. Nach vier Passagen wurden sie zur Virusinfektion verwendet. Als Nährmedium diente TCM Nr. 199 mit oder ohne Glykogen und Mannose, Stärke und Maltose.

Tab. 9 Empfänglichkeit der EML-Kultur von der 56. Passage an gegenüber verschiedenen Virus-Arten nach vier Passagen im Kulturmedium mit oder ohne Zusatz von verschiedenen Zuckerarten.

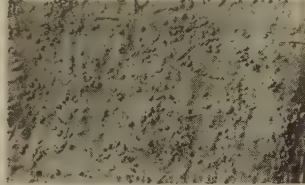
Virusstämme	Glykogen } 100 mg		Stärke } 100 mg		Kontrollversuch	
	Mannose		Maltose			
	CPE	ID ₅₀	CPE	ID ₅₀	CPE	ID ₅₀
Vaccinavirus	+	10 ^{4,0}	+	10 ^{3,5}	+	10 ^{3,3}
Adenovirus 3	-		-		-	
Coxsackievirus A ₉	-		-		-	
Poliovirus 1	-		-		-	
ECHO - Virus 3	-		-		-	

Die EML-Kultur der 60. Passage zeigt, im Gegensatz zu derjenigen der 28. Passage, nach der Vaccinevirus-Infektion einen deutlich cytopathischen Effekt. Ihre Empfänglichkeit gegenüber den anderen Virus-Arten blieb unverändert. Sind die Nährmedien Glykogen und Mannose vorhanden, weicht die Virusproduktion von der im Kontrollversuch kaum ab. Die Kultur, die im Nährmedium mit Zusatz von Glykogen und Mannose gezüchtet wurde, ergab etwas mehr Vaccinevirus als die Kultur im anderen Nährmedium. Das liegt vielleicht daran, dass Glykogen und Mannose bestimmte Enzymaktivitäten der Zellen entfaltet haben, so daß die Virus-Synthese gefördert wird.

Abb. 4 Cytopathischer Effekt des Herpesvirus, Vaccinevirus und Para-Influenzavirus 1 Sendai in der EML-Kultur



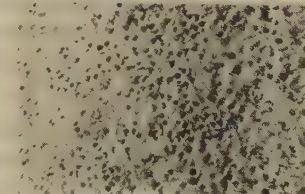
normale EML-Zellkultur
(Vergrößerung 1:120)



2 Tage nach der Infektion
mit Herpesvirus (Vergr. 1:120)



2 Tage nach der In-
fektion mit Vaccine-
virus (Vergr. 1:120)



2 Tage nach der Infektion
mit Parainfluenzavirus 1
Sendai (Vergr. 1:120)

Besprechung

Die Anwendung von Trypsin zur Dispersion der Zellen wurde zuerst von Rous und Jones im Jahre 1916 beschrieben. 1952 ist diese Methode wieder aufgegriffen worden (Moscona 1952, Dulbecco 1952). Viele Modifikationen und Verfeinerungen (Marcus et al. 1956, Younger 1954, Haff u. Swim 1956, Weinstein et al. 1956, Bodian 1956, May 1959 und andere), welche eine bessere Zell-ausbeute ergeben, wurden in einer grossen Zahl von Laboratorien als Routine-Arbeit für bestimmte Organe angewendet. Trypsin ist jedoch nicht immer harmlos. Unter bestimmten Bedingungen kann es die Zellen schädigen (Magee et al. 1958). Es zeigt sich, dass ein grosser Teil der Zellen während der Trypsineinwirkung geschädigt wird und der Prozentsatz der Ausbeute an gesunden Zellen gering ist. Deswegen haben Puck et al. (1957) die Trypsinierungszeit stark eingeschränkt, um die Schädigung der Zellen durch zu lange Trypsineinwirkung zu vermeiden. Wir konnten feststellen, dass die Zellen gegen die Trypsineinwirkung relativ resistent sind. Die Schädigung tritt erst dann schnell ein, wenn man die Zellsuspension in der Trypsinlösung schüttelt oder abzentrifugiert. Auf Grund dieser Beobachtungen haben wir eine Methode entwickelt, mit welcher die Zellausbeute der embryonalen Mäuselungen im Vergleich mit der Methode von Dulbecco und Vogt um das 24-fache erhöht wurde.

Zur Gefäßreinigung werden die üblichen Waschmittel verwendet. Viele von ihnen wirken auf die Zellen toxisch und sind deswegen zur Reinigung der Glasgefäße für Zwecke der Gewebekultur unbrauchbar. Hemosol, Rei und Hostapon, welche seit längerer Zeit in unserem Labor und anderen Laboratorien gebraucht wurden, wurden von uns und anderen als nicht toxische Waschmittel betrachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich gezeigt, dass diese Waschmittel auch nach 20-maliger Ausspülung mit Leitungswasser und 3-maliger Nachspülung mit Aqua dest. nicht vollständig entfernt werden können und ihre restlichen Moleküle eine toxische Wirkung auf die EML-Zellen ausüben. Obwohl eine ähnliche toxische Wirkung der Waschmittel auf andere Zellarten bis jetzt nicht beobachtet wird, kann daraus nicht geschlossen werden, dass die Waschmittel für die Zellen harmlos sind.

Die wahrscheinlich vorhandene geringe Toxizität ist wohl eine der Ursachen, welche zum Mißlingen der Herstellung von Dauer-Zellstämmen in unseren früheren Versuchen ^{und} in anderen Laboratorien geführt hat.

Im Vergleich mit den Epithelialzell-Stämmen sind Fibroblasten-Stämme nicht viel gezüchtet worden. Der erste von Earle (1943) hergestellte L-Stamm unterscheidet sich morphologisch von Epithelialzellen, besitzt aber auch keine charakteristisch fibroblastische Form mehr. Die morphologische Wandlung von Fibroblasten wurde außer an L-Zellen auch an menschlichen Lungenzellen von Henle und Deinhardt (1957) und Affenherzmuskelzellen (Corwiel et al. 1958) beobachtet. Im Gegensatz zu den obengenannten Autoren wurde auch berichtet, daß trotz mehrerer Passagen und langer Züchtungsdauer keine morphologische Veränderung der Zellen eintritt (menschliche Haut-Fibroblasten von Puck et al. 1957, menschliche embryonale Lungen- und Nieren-Fibroblasten, Ratten- und Mäuse-Lungenfibroblasten von Szanto 1959, Kaninchen-Fibroblasten von Haff und Swim 1956). Puck (1957) konnte mittels der Clone-Technik beweisen, dass die Form der Fibroblasten beständig ist. Er behauptete, dass viele der von anderen Autoren berichteten spontanen und induzierten morphologischen Änderungen eine Folge der Veränderung der Population sei. Diese Annahme stimmt mit unserem Ergebnis überein. Während der Herstellung des Zellstammes haben wir festgestellt, dass das morphologische Bild der Kultur sich von Zeit zu Zeit ändert. Der endgültige Stammzelltyp ist in der Mitte der 5. Passage schon vorhanden. Das Wachstum dieser Zellen ist jedoch noch sehr langsam und erst nach ca. 120 Tagen (5 Passagen) wachsen sie deutlich schneller als die anderen Zelltypen und beherrschen allmählich das ganze Bild.

Viele Autoren haben berichtet, dass Embryonalextrakt für das Wachstum der Fibroblasten sehr wichtig ist (Willmer 1958, Jacoby et al. 1937, Puck et al. 1957). Ohne den Zusatz von Embryonalextrakt zeigen die Zellen nach einer kurzen Zeit kein oder nur schwaches Wachstum. Deswegen sind sämtliche bisher gezüchteten Fibroblasten-Stämme mit Nährmedium und Embryonalextrakt gewonnen worden. Da Embryonalextrakt nur wachstumsfördernd und für die Dauerzüchtung der Fibroblasten nicht unbedingt erforderlich ist, haben wir den EML-Zellstamm mit Nährmedium ohne Embryonalextrakt gewinnen können.

Der wichtigste Bestandteil des Nährmediums zur Gewinnung eines Zellstammes (sowohl Fibroblasten - als auch Epithelialzell-Stamm) ist das Serum. Das Vorhandensein von Hemmstoffen im Serum ist die Hauptursache des Mißlingens der Zellstammgewinnung (Chang 1954, Puck et al. 1958).

Die morphologische Umwandlung, die "Transformation" der Zellen während der Ausbildung des Epithelialzellstammes wurde von Berman et al. 1955, 1957, Jordan 1956, Perry et al. 1956, Ziteer u. Dunnebacke 1957, Westwood et al. 1957, Parker 1957, Baron u. Rabson 1957 beobachtet und beschrieben. Nach Berman et al. (1956) und Westwood et al. (1957) treten zwischen dem 21. und dem 65. Tag nach der Primärkultur gleichzeitig an vielen Stellen der Kultur viele kleine isolierte polygonale Zellinseln hervor. Diese Umwandlung tritt meistens erst dann auf, wenn das Zellwachstum sich verlangsamt oder aufhört. Diese neu hervorgetretenen Zellen wachsen schnell und lassen sich leicht umsetzen. Über die Umwandlung oder "Transformation" von Fibroblasten finden sich nur Angaben bei Earle (1943), Parker (1955), Swim und Parker (1957), Henle und Deinhardt (1957). Danach kommt in der langsam wachsenden Kultur ein neuer Zelltyp vor, welcher nach kurzer Zeit das morphologische Bild der Kultur bestimmt. Die von uns beobachtete Veränderung zeigt einen anderen Ablauf.

1. Eine lange Inkubationszeit: Die ersten Stammzellen wurden bereits in der Mitte der 5. Passage beobachtet. Nach ca. 120 Tagen (5 Passagen) fangen sie an, schnell zu wachsen. Sechs Wochen später haben sie die anderen Zelltypen ganz verdrängt.
2. Während des ganzen Umwandlungsvorganges wurden nie Zellinseln beobachtet.
3. Es tritt kein multizentrisches Wachstum auf.
4. Die Stammzellen sind von den sie umgebenden Zellen nicht scharf abgegrenzt.
5. Sie sind für eine Reihe von Umweltfaktoren, wie z.B. Waschmittel, Trypsin, Hemmstoffen im Serum, Änderung der Bestandteile des Nährmediums u.a. viel empfindlicher als andere Zellstämme.

6. Das Verhalten der Kultur gegen Versen und Trypsin ist vor und kurz nach dem Umwandlungsvorgang gleich. Die Kulturen werden nach derselben Einwirkungszeit von dem Boden abgelöst und zerfallen in Einzel-Zellen. Weder mit Trypsin noch mit Versen allein kann man eine gute Zellsuspension ohne grossen Zellverlust erzielen.

Außer Punkt 2 und 3 widersprechen alle anderen 4 Punkte den Beobachtungen der anderen Autoren, denn bis jetzt wurden in der Literatur ähnliche Beobachtungen nicht geschildert.

Es muß angenommen werden, dass Verunreinigungen einer Gewebekultur mit Zellen eines anderen Zellstammes häufiger vorkommen, als allgemein vermutet wird. Da Verunreinigungen durch Zellstämme, die von der gleichen Tierart stammen, nicht erkannt werden können, sind bis jetzt nur wenige Arbeiten veröffentlicht worden. Einige Kulturen, welche die Autoren durch "Transformation" gewonnen haben, sind jetzt mittels der Chromosomenanalyse (Hsu u. Klatt 1958, Ford und Yerganian 1958), der serologischen Technik (Coriell et al. 1958, Kunnin et al. 1960) und des Transplantationsspezifitätstests (Swim 1959) als Verunreinigungen identifiziert worden. Dass das Bild der Verunreinigungen der Kulturen durch einen Laborzellstamm mit dem der "Transformation" übereinstimmt, lässt sich im Versuch leicht zeigen. Es wurde andererseits in der Literatur auch mittels der Chromosomenanalyse und Clone-Technik gezeigt, dass die Zellen sich dauernd in genetischer Änderung befinden. Dabei werden die Zellen nach mehreren Passagen heteroploid (Hsu u. Moorehead 1957, Levan 1956, Westwood u. Titmus 1957, und andere) und zeigen deutlich eine genetische Neuordnung der Chromosomen (Levan 1956, Hsu u. Klatt 1958, Hsu u. Moorehead 1956, Ford und Yerganian 1958). Viele Mutanten der Stammzellen sind von einigen Autoren sowohl mit als auch ohne Clone-Technik isoliert worden (Chang 1958, Mc Quilkin et al. 1957, Sanford et al. 1954, Selawry et al. 1957, Puck u. Fisher 1956, Sanford 1958, Perry et al. 1955). Es ist daher denkbar, dass die "Transformation" der Zellen einerseits von Verunreinigungen durch bekannte Laborstämme herrührt, dass die "transformierten" Zellen andererseits aber auch solche sind, welche durch Mutation schon lange in der Kultur vorhanden waren und erst später durch Selektion in Erscheinung

traten, wie es unser Zellstamm zeigte. Aus diesen Literaturangaben und unseren Versuchsergebnissen können wir schliessen, dass im Mechanismus der Umwandlung der Zellen keine Transformation, sondern eine Mutation und Selektion zu sehen ist, denn das Vorhandensein von cytoplasmatischen Faktoren oder Transformationsagentien ist noch nie beschrieben worden.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass einige tierische Fibroblastenstämme für das Herpesvirus, das Vaccinevirus oder das Influenzavirus empfänglich sind. In dem von Stulberg u. Schapira (1953) isolierten Embryonal-Hühnerfibroblastenstamm wurde eine Vermehrung des Influenzavirus A PR₈ mit cytopathischem Effekt beobachtet. Das Herpesvirus verursachte dagegen nur die Einschlußkörperchenbildung in der Kultur. Haff und Swim (1956) haben die Empfänglichkeit von drei Kaninchen-Fibroblastenstämmen für das Vaccinevirus beschrieben. Ein cytolytischer Effekt des Influenzavirus A PR₈ auf L-Zellen wurde von Smith und Morgan (1960) beobachtet. Einen cytopathischen Effekt zeigen nach den umfangreichen Untersuchungen von Henle und Deinhardt (1957) nur das Herpesvirus, das Vaccinevirus und das Pseudorabiesvirus in dem Lung-To-Stamm. Unser Zellstamm EML war in den früheren Passagen nur für das Herpesvirus empfänglich. Die Kultur zeigte nach der Infektion einen deutlichen cytopathischen Effekt, den man auf weitere Passagen übertragen kann. Von der Influenza- und Parainfluenza-Virus-Gruppe erzeugen nur der ei-adaptierte Sendai-Stamm und der mäuse-adaptierte Asia-Stamm einen cytopathischen Effekt. Die von den Zellen produzierten Viren sind nichtinfektiöses Haemagglutinin, welches sich in der nächsten Passage nicht mehr vermehren kann.

Im Vergleich mit der 28. Passage hat die Kultur von der 60. Passage ihre Empfänglichkeit gegenüber dem Vaccinevirus geändert, denn in den Kulturen nach 60 Passagen vermehrt sich das Vaccinevirus und verursacht einen cytopathischen Effekt. Die Kultur der 28. Passage ist dagegen gegen dieses Virus resistent. Dieses Ergebnis bestätigt auch die in der Literatur bereits beschriebene Tatsache, daß sich der Zellstamm nach seiner Gewinnung immer noch ändert (Earle et al. 1950, Gey 1954-55, Parker et al. 1957, Murphy u. Armstrong 1959, Vogt u. Dulbecco 1958, Kleinfeld u. Melnik 1958, Puck u. Fisher 1956).

Darüber, dass durch den Zusatz von einigen Substanzen wie z.B. Aminosäuren und Glucose, zum Nährmedium die Empfänglichkeit der Zellen gegenüber einigen Virusarten erhöht wird, wurde bereits von einigen Autoren berichtet. Die Kultur der 56. Passagen zeigte nach vier Passagen im Kulturmedium mit Glycogen und Mannose eine geringe Vermehrung des Vaccinevirus. Die Virusaussbeute wurde im Vergleich mit der Kontroll-Kultur von $10^{3,3}$ ID₅₀ auf $10^{4,0}$ ID₅₀ erhöht. Es ist möglich, dass die beiden Zucker einige Enzyme aktiviert haben, so daß der Virussyntese-prozess begünstigt wurde.

Zusammenfassung

1. Es wird eine Methode zur Anlage einer embryonalen Zellkultur geschildert. Mit dieser Methode kann man eine 24-fach bessere Zellausbeute bekommen, als mit der Methode von Dulbecco und Vogt.
2. Während der Gewinnung des Dauer-Zellstammes EML wurde eine deutliche Wandlung der Zellen beobachtet. Die Stammzellen kommen schon in der Mitte der 5. Passage vor. Ihre Vermehrung war anfangs nicht stärker als die der anderen Zelltypen, erst nach ca. 120 Tagen (5Passagen) zeigten sie ein schnelles Wachstum und beherrschten sechs Wochen später die ganze Kultur.
3. Es wurde eine toxische Wirkung der im Gefäß verbliebenen Hemosol-Molekülreste auf die Stammzellen festgestellt. Die Zellen zeigten kurz nach dem Umsetzen eine deutliche Degenerationserscheinung. Sie erholten sich nach zwei Tagen wieder.
4. Die Zellen waren in den frühen Passagen nur für das Herpesvirus empfänglich. Das eiadaptierte Parainfluenzavirus 1 Sendai und das mäuseadaptierte Influenza A₂ Asia, zeigen in der Zellkultur einen leichten cytopathischen Effekt. Sie bilden ein Haemagglutinin, aber kein infektiöses Virus. Das Polio-, das Adeno-, das Coxsackie-, und das ECHO-Virus können sich in dieser Kultur nicht vermehren.
5. Eine Empfänglichkeitsänderung der Zellen gegenüber dem Vaccinevirus wurde nach 32 Passagen, d.h. fünf Monate nach der letzten Empfänglichkeitsbestimmung, beobachtet. Die anfangs resistenten Zellen waren in der 60. Passage für das Vaccinevirus empfänglich geworden.
6. Die Kultur, die in Nährmedium mit Zusatz von Glykogen und Manno-se gezüchtet wurde, ergab etwas mehr Vaccinevirus als die Kultur in anderen Nährmedien.

Schrifttum

1. Ackermann W.W.: The role of l-methionine in virus propagation.
J. Exp. Med. 93, 337, 1951
2. Baron S. and A.S. Rabson: A culture (LAC) of human epithelial-like cells from an adenocarcinoma of the lung
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 96, 515, 1957
3. Bell S.D. and R.E. Johnson: A strain of unclassified cells isolated from lymph node of patient with Reticulo-Endotheliosis.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 92,46, 1956
4. Berman L. and C.S. Stulberg: Eight culture strains (Detroit) of human epithelial-like cells
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 92, 730, 1956
5. Berman L., C.S. Stulberg and F.M. Ruddle: Long term tissue culture of bone marrow - 1. report of isolation of a strain of cells resembling epitheloid cells from bone marrow of a patient with carcinoma of the lung.
Blood 10, 896, 1955
6. Berman L., C.S. Stulberg and F.M. Ruddle: Human cell culture Morphology of the Detroit strain
Cancer Res. 17, 668, 1957
7. Bodian D.: Simplified methode of dispersion of monkey kidney cells with trypsin.
Virology 2, 575, 1956
8. Brand K.G. and J.T. Syvertsen: Hemagglutinationstest for species specificity of cultivated mammalian cells.
Proc.Am.Ass.Canc.Res. 3,8,1959
9. Brown L.V.: Pathogenicity for rabbits kidney cell cultures of certain agents derived from "normal" monkey kidney I. isolation and propagation.
Am.J.Hyg. 65, 189, 1957
10. Chang R.S.: Contineous subcultivation of epithelial like cells from normal human tissue.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 87, 440 1954
11. Chang R.S.: Difference in inositol requirements of several strains of HeLa, conjunctival and amnion cells.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 99,99, 1958
12. Chavremont: Diskussion von der Arbeit "Weymouth C.: Nutrition and metabolism of animal tissue culture"
J.Nat.Cancer Inst. 19, 537, 1957.

13. Corriell L.L., R.M. McAllister, A. Greene, W. Flagg,
M. Tall and B. Wagner: In vitro and vivo studies on a tissue
culture cell line derived from normal monkey heart.
J. Immunol. 80, 142, 1958
14. Coriell L.L., M.G. Tall and H. Gaskill: Common antigen in
tissue culture cell line.
Science 128, 198, 1958
15. Darnell J.E. and H. Eagle: Glucose and glutamine in poliovirus
production by HeLa cells.
Virology 6, 556, 1958
16. Deinhardt F. and G. Henle: Studies on the viral spectra of tissue
culture lines of human cells.
J. Immunol. 79, 60, 1957
17. Dulbecco R.: Production of plaque in monolayer tissue cultures
by single particles of animal virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 747, 1952
18. Dulbecco R. and M. Vogt: Plaque formation and isolation of
pure lines with poliomyelitis virus.
J. Exp. Med. 99, 167, 1954
19. Eagle H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid
carcinoma strain K.B.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 362, 1955
20. Earle W.R.: Production of malignancy in vitro.
IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen
in the living cells
J. Nat. Cancer Inst. 4, 156, 1943
21. Earle W.R., V.J. Evans, M.F. Edward and E. Duchesne:
Influence of perforation design on growth of tissue
cells under perforated cellophane sheets in vitro.
J. Nat. Cancer Inst. 10, 291, 1949
22. Earle W.R., V.J. Evans and E.L. Schilling: Extension of
cellophane substrate procedure to growth of in vitro cultu-
res of large areas.
J. Nat. Cancer Inst. 10, 943, 1950
23. Earle W.R., V.J. Evans, K.K. Sanford, J.E. Shannon and H.K. Waltz:
Influence of glass and cellophane substrates on prolifera-
tion of strain L in tissue culture.
J. Nat. Cancer Inst. 12, 563, 1951.

24. Earle W.R., E.L. Schilling and J.E. Shannon: Growth of animal tissue cells on three dimensional substrates
J.Nat.Cance Inst. 12, 179, 1951
25. Earle W.R., K.K. Sanford, V.J. Evans, H.K. Waltz and J.E. Shannon: The influence of inoculum size on proliferation in tissue cultures.
J.Nat. Cancer Inst. 12, 133, 1951
26. Earle W.R. and F. Highhouse: Culture flasks for use with plane surface substrate tissue cultures.
J.Nat.Cancer Inst. 14, 841, 1954
27. Earle W.R., E.L. Schilling, J.C. Bryant and V.J. Evans: The growth of pure strain L cells in fluid-suspension cultures.
J.Nat.Cancer Inst. 14, 1159, 1954
28. Enders J.F. and Peebles T.C.: Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles.
Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 86, 277, 1954
29. Evans A.S.: Establishment of human adult tonsil cells in continuous culture and their virus susceptibilities.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 96, 752, 1957
30. Evans V.J., and W.R. Earle: The use of perforated cellophane for the growth of cells in tissue culture
J.Nat.Cancer Inst. 8, 103, 1947
31. Evans V.J., W.R. Earle, K.K. Sanford, J.E. Shannon and K.K.Waltz: The preparation and handling of replicate tissue cultures.
J.Nat.Cancer Inst. 11, 907, 1951
32. Evans V.J., J.C. Bryant, M.C. Fioramonti, W.T. Mc Quilkin, K.K. Sanford, B.B. Westwood and W.R. Earle: Studies of nutrient media for tissue cells in vitro.
I. A protein free chemically defined medium for cultivation of strain L cells
Cancer Res. 16, 77, 1956
33. Evans V.J., J.C. Bryant, W.T. Quilkin, M.C. Fioramonti, K.K. Sanford, B.B. Westwood and W.R. Earle: Studies of nutrient media for tissue cells in vitro
II. An improved protein free chemically defined medium for long term cultivation of strain L 929 cells
Cancer Res. 16, 87, 1956.

34. Evans V.J., N.M. Hawkins, B.B. Westfall and W.R. Earle:
Studies on culture lines derived from mouse liver
parenchymatous cells grown in long term tissue culture
Cancer Res. 18, 261, 1958
35. Fogh J. and K.A. Hok: Tumor produced in X-ray and cortisone-
treated rats given injection of human cells in
continuous culture
Cancer Res. 18, 692, 1958
36. Fogh J. and R.D. Lund: Continuous cultivation of epithelial
cell strain (FL) from human amniotic membrane.
Proc. Soc.Exp.Biol.Med. 94, 532, 1957
37. Ford D.K., and G. Yerganian: Observation on the chromosomes
of chinese hamster cells in tissue culture.
J.Nat.Cancer Inst. 21, 393, 1958
38. Frisch A.W., V. Jentoft, R. Barge, and E.J. Losli:
A human epithelium like cell (MABEN) derived from an
adenocarcinoma of lung. Isolation, continuous propagation
and effect of selected viruses.
Am.J.Clin.Path. 25, 1107, 1955
39. Gey G.O.: Some aspects of the constitution and behaviour of
normal and malignant cells maintained in continuous
tissue culture.
Harvey Lectures series 50, 154, 1954-55
40. Gey G.O., W.D. Coffman and M.T. Kubicek: Tissue culture studies
of proliferate capacity of cervical carcinoma and normal
epithelium
Cancer Res. 12, 264, 1952
41. Haff R.F. and Swim: Serial propagation of 3 strains of
rabbit fibroblasts, their susceptibility to infection
with vaccinia virus.
Proc. Soc.Exp.Biol.Med. 93, 200, 1956
42. Henle G. and F. Deinhardt: The establishment of strains of human
cells in tissue culture
J. Immunol. 79, 54, 1957
43. Hsu T.C. and C. Klatt: Mammalian chromosomes in vitro.
IX. On genetic polymorphism in cell populations
J.Nat.Cancer Inst. 21, 437, 1958.

44. Hsu T.C. and P.S. Moorehead: Mammalian chromosomes in vitro
VII. Heteroploidy in human cell status.
J.Nat.Cancer Inst. 18, 463, 1957
45. Hull R. N., J.R. Minner and J.W. Smith: New viral agents recovered from tissue culture of monkey kidney cells.
I. Origin and properties of cytopathogenic agents SV₁, SV₂, SV₄, SV₅, SV₆, SV₁₁, SV₁₂ and SV₁₅
Am. J. Hyg. 63, 204, 1956
46. Jacoby F., O.A. Trowell and E.N. Willmer: Further observations on the manner in which cell division of chick fibroblasts is affected by embryo tissue juice.
J.Exp.Med. 14, 255, 1937
47. Jahnes W.G., H.M. Fullmer and C.P. Li: Free living amoebas as contaminants in monkey tissue cultures.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 96, 484, 1957
48. Jordan W.S.: Human nasal cells in continuous culture
I. Establishment of 2 lines of epithelial-like cells
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 92, 867, 1956
49. Kleinfeld R. and J.L. Melnik: Cytological aberrations in cultures of "normal" monkey kidney epithelial cells.
J.Exp.Med. 107, 599, 1958
50. Krech U. and H. Wulff: Die cytopathogenen Veränderungen in Gewebekulturen von Erstkulturen und Zellpassagen menschlicher Amnionzellen nach Beimpfung mit verschiedenen Virusstämmen
Ztsch.f.Imm. Forsch. 114, 416, 1957
51. Kunin C.M., L.R. Emmons and W.S. Jordan: Detection of cells of heterologous origin in tissue culture and their segregation by the use of differential media
J.Immunol. 85, 203, 1960
52. Levan A.: Chromosome studies on some human tumors and tissues of normal origin, grown in vivo and in vitro at the Sloan-Kettering Institute.
Cancer 9, 648, 1956
53. Lieberman I. and P. Ove: Catalase requirement for mammalian cells in culture
J. Exp. Med. 108, 631, 1958.

54. Likely G. D., K.K. Sanford and W.R. Earle: Further studies on the proliferation in vitro of single isolated tissue cells
J. Nat. Cancer Inst. 13, 177, 1952
55. Magee W.E., M.R. Sheek and B.P. Sagik: Methode of havesting mammalian cells grown in tissue culture
Proc.Soc.Exp.Med. 99, 390, 1958
56. Malherbe H. and R. Harwin: Seven viruses isolatet from the vervet monkey.
Brit.J.Exp.Path. 38, 539, 1957
57. Marcus P.I., S.J. Cieciura and T.T. Puck: Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissue
J. Exp. Med. 104, 615, 1956
58. May G.: Zur Verwendung von Caseinhydrolysat als Nährmedium für Gewebekulturen
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 175, 481, 1959
59. Mc Allister R.M. and L.L. Coriell: Cultivation of human cells in tissue culture
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 91, 389, 1956
60. Mc Allister R.M. and L.L. Coriell: Tumorigenicity of tissue culture cells
Cancer Res. 19, 1040, 1959
61. Mc. Quilkin W.T., V.J. Evans and W.R. Earle: The adaptation of additional lines of NCTC clone 929 (strain L) cells to chemically defined protein-free medium NCTC 109
J. Nat. Cancer Inst. 19, 885, 1957
62. Moore A.E.: Do cells become malignant under condition of continuous cultures?
Poliomyelitis 1958, 268
63. Moore A.E.: Tumorigenic activity of cultures
Ann. N.Y. Acad.Sci. 76, 497, 1958
64. Moore A.E., C.M. Southan and S.S. Sternberg: Neoplastic changes developing in epithelial cell lines derived from normal persons.
Science 124, 127, 1956
65. Moscona A.: Cell suspension from organ rudiments of chick embryos
Exp.Cell Res. 3, 535, 1952

66. Murphy W.H. and R. Armstrong: Differentiation of closely related cells by a variant of poliovirus Type 2 MEFl strain
J.Exp.Med. 110, 629, 1959
67. Osgood E.E. and J.H. Brooke: Continuous tissue cultures of leucocytes from human leukemic bloods by application of "gradient" principles
Blood 10, 1010, 1955
68. Parker R.C.: Cultivation of tumor cells in vitro
Canad.cancer conf. 1, 42, 1955
69. Parker R.C., L.N. Castor and E.A. McCulloch: Altered cell strains in continuous culture. A general survey
Ann. N.Y. Acad.Sci.Spec.Publ. 5, 303, 1957
70. Perry V.P., V.J. Evans and W.R. Earle:
Cultivation of large cultures of HeLa cells in horse serum
Science 121, 805, 1955
71. Perry V.P., V.J. Evans, W.R. Earle, G.W. Hyatt and W.C. Bedell:
Long term tissue culture of human skin
Am.J.Hyg. 63, 52, 1956
72. Puck T.T., S.J. Cieciura and H.W. Fisher: Clonal growth in vitro of human cells with fibroblastic morphology. Comparison of growth and genetic characteristics of single epitheloid and fibroblast-like cells from a variety of human organs
J.Exp.Med. 106, 145, 1957
73. Puck T.T., S.J. Cieciura and A. Robinson: Genetic of somatic mammalian cells. III. long term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.
J. Exp.Med.108, 945, 1958
74. Puck R.R. and H.W. Fisher: Genetic of somatic mammalian cells
I. Demonstration of the existence of mutants with different growth requirements in a human cancer cell strain (HeLa)
J.Exp.Med. 104, 427, 1956.
75. Rous P. and F.S. Jones: A method for obtaining suspension of living cells from the fixed tissues and for the plating out of individual cells.
J.Exp.Med.23, 549, 1916
76. Rowe W.P., R.J. Huebner, L.K. Gilmore, R.H. Parrot and T.G.Ward:
Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 84, 570, 1953.

77. Ruckle G.: Studies with the Monkey-Intra-Nuclear-Inclusion-Agent (MINIA) and Foamy -Agent derived from spontaneously degenerating monkey kidney cultures. I. Isolation and tissue culture behavior of the agents and identification of MINIA as closely related to measles virus.
Arch. Ges.Virusforsch. 8, 138, 1958.
78. Rustigian R., P. Johnston and H. Reihard: Infection of monkey kidney tissue cultures with viruslike agents
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 88,8, 1955
79. Ruzicka P.: Incidence of microfilaria in monolayer monkey kidney cells cultures
Acta Microbiologica Hung. 6, 153, 1959
80. Sanford K.K.: Clonal studies on normal cells and on their neoplastic transformation in vitro
Cancer Res. 18, 747, 1958
81. Sanford K.K., W.R. Earle and G.D. Likely: The growth in vitro of single isolated tissue cells.
J. Nat. Cancer Inst. 9, 229, 1948
82. Sanford K.K., W.R., Earle, V.J. Evans, H.K. Waltz and J.E. Shannon: The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei.
J. Nat. Cancer Inst. 11, 773, 1951
83. Sanford K.K., G.D. Likely and W.R. Earle: The development of variations in transplantability and morphology within a clone of mouse fibroblasts transformed to sarcoma-producing cells in vitro.
J.Nat.Cancer Inst. 15, 215, 1954
84. Sanford K.K., R.M. Merwin, G.L. Hobbs, M.C. Fioamonti and W.R. Earle: Studies on the difference in sarcomaproducing capacity of two lines of mouse cells derived in vitro from one cell.
J.Nat.Cancer Inst. 20, 121, 1958.
85. Schilling E.L., W.R. Earle and V.J. Evans: Use of perforated cellophane substrate in slide preparation tissue cultures
J.Nat.Cancer Inst. 10, 883, 1950.

86. Schwöbel W. und V. Siedentopf: Charakterisierung eines drei Jahre-
alten Zellstammes aus der Schweineniere und Untersuchungen
über sein Verhalten gegenüber dem Virus der Maul- und
Klauenseuche.
Zbl.f.Bakt. I. Orig. 181, 3, 1961
87. Selawry O.S., M.N. Goldstein and T. Mc Cormick:
Hyperthermia in tissue-cultured cells of malignant origin.
Cancer Res. 17, 785, 1957
88. Shannon J.E., W.R. Earle and H.K. Waltz: Massive tissue cultures
prepared from whole chick embryo planted as a cell sus-
pension on glass substrate.
J.Nat. Cancer Inst. 13, 349, 1952
89. Sheffield F.W. and G.M. Churcher: The serial propagation of po-
liomyelitis viruses in cells derived from rabbits embryo
kidney.
Brit.J. Exp. Path. 38, 155, 1957.
90. Shelokov A., J.E. Vogel and L. Chi: Hemadsorption (Adsorption-
Hemagglutination) test for viral agents in tissue culture
with special reference to influenza.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 98, 802, 1958
91. Smith D.H. and H.R. Morgan: A cytopathogenic effect of influenza
virus (PR₈ strain) for mouse fibroblastic (L) cells in
vitro.
J. Immunol. 85, 180, 1960
92. Stulberg C.S. and R. Schapira: Virus growth in tissue culture
fibroblasts. I. Influenza A and Herpes simplex viruses
J. Immunol. 70, 51, 1953
93. Swim H.E.: Microbiological aspects of tissue culture
Ann. Rev. Microbiol. 13, 141, 1959
94. Swim H.E. and R.F. Parker: Culture characteristics of human
fibroblasts propagated serially.
Am. J. Hyg. 66, 235, 1957
95. Syverton J.T. and L.C. Mc Laren: Human cells in continuous cul-
ture. 1. Derivation of cell strains from esophagus, pala-
te, liver and lung.
Cancer Res. 17, 923, 1957.

96. Szántó J.: Experiments on the long term cultivation of human embryonic and animal cells
Acta Virologica 3 (suppl.), 35, 1959
97. Tyndall R.L., and E.H. Ludwig: Nutritional requirements for production of polio type II, Cocksackie B₃, Vaccinia viruses by continuous animal cell cultures.
J. Bact. 80, 96, 1960.
98. Vogt M., and R. Dulbecco: Properties of a HeLa cell culture with increased resistance to poliomyelitis virus
Virology 5, 425, 1958
99. Weinstein H.J., C. Alexander, G.H. Yoshihara, and W.M. Kirby: Preparation of human amnion tissue culture
Proc.Soc. Exp. Biol.Med. 92, 535, 1956
100. Westwood J.C.N., I.A. Mac Pherson and D.H.J. Titmus: Transformation of normal cells in tissue culture: its significance relative to malignancy and virus vaccine production
Brit.J.Exp.Path. 38, 138, 1957
101. Westwood J.C.N. and D.H.J. Titmus: Transformation in tissue culture cell lines: The possible genetic mechanism
Brit.J.Exp.Path. 38, 587, 1957
102. Willmer E.N.:
Tissue culture 3rd.Ed. 1958, London
103. Wong S.C. and E.D. Kilbourne: Changing viral susceptibility of a human cell line in continuous cultivation
1. Production of infectious virus in a variant of the Chang conjunctival cell following infection with swine or NWS influenza virus
J.Exp.Med. 113, 95, 1961
104. Younger J.S.: Monolayer tissue culture. I. Preparation and standardization of suspension of trypsin-dispersed monkey kidney cells.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 85, 202, 1954.
105. Zitcer E.M. and T.H. Dunnebacke: Transformation of cells from the normal human amnion into established strain
Cancer Res. 17, 1047, 1957
106. Zwartow H.T. and J.C.N. Westwood: Factors affecting growth and glycolysis in tissue culture.
Brit.J.Exp.Path.39,529, 1958.

Herrn Professor Dr. K. Herzberg möchte ich
meinen Dank für die Überlassung des Themas
aussprechen.

Ebenfalls danke ich Herrn Oberarzt Dr. G. May,
der mich bei der Durchführung der Arbeit
unterstützte.

Lebenslauf

Ich, Hsin-Lu Shu, bin am 28. Okt. 1925 als Sohn des Kaufmanns Wen-Jau Shu und seiner Ehefrau Je-Li Che Shu in Ningpo, Provinz Chekiang, China, geboren.

Von 1932 bis 1938 besuchte ich in Shanghai die Grundschule. 1938 bestand ich die Aufnahmeprüfung in der provinziellen Jan-Chau Mittelschule und lernte dort 3 Jahre lang, dann trat ich in die Deutsche Chinesische Mittelschule über. 1944 bestand ich das Abitur.

Nach 6-monatiger Vorausbildung wurde ich im Jahre 1944 an der Deutschen Medizinischen Akademie Shanghai immatrikuliert. 1945 wurde diese Akademie mit der Tung-Chi Universität zusammengelegt und ich studierte an dieser Universität weiter. 1946 machte ich das Physikum. 1949 bestand ich mit gutem Erfolg das Staatsexamen.

Ich habe in den Universitätskliniken ein Jahr als Pflichtassistent gearbeitet. 1950 wurde ich in dem bakteriologischen Institut der Medizinischen Fakultät der Tung-Chi Universität als Assistent eingestellt. Dort war ich bis 1953 tätig, dann arbeitete ich bis 1957 in dem bakteriologischen Institut der 2. Medizinischen Akademie Shanghai und von 1957 bis 1958 in der Klinik der St. Peter Kirche, Castle Peak, Hong Kong.

1956 wurde ich an der 2. Medizinischen Akademie Shanghai zum Dozenten befördert.

1958 hatte der Deutsche Akademische Austauschdienst mir ein Assistentenstipendium zur Weiterausbildung an einem Hochschulinstitut bzw. an einer Klinik in der Bundesrepublik Deutschland zugesprochen. Im Oktober 1958 wurde ich von dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt am Main als Gastarzt aufgenommen. Seit 1959 arbeite ich als Doktorand bei Herrn Professor Dr. Herzberg an demselben Institut.

Ich habe an der Universität Frankfurt am Main schon 6 Semester studiert und beabsichtige, im Februar 1962 mit dem Examen Rigorosum zu beginnen.

